

Alternatív kardioprotektív eljárások és azok hatásai a miokardiális peroxinitritre, RISK és SAFE jelátviteli utakra

PhD értekezés összefoglalója

Dr. Pipicz Márton

Témavezetők:

Dr. Csont Tamás, PhD és Dr. Csonka Csaba, PhD

Metabolikus Betegségek és Jelátvitel Kutatócsoport

Biokémiai Intézet

Általános Orvostudományi Kar

Szegedi Tudományegyetem



Szeged
2017

Publikációk listája

1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája

- I. **Pipicz M.**; Kocsis G.F.; Sarvary-Arantes L.; Bencsik P.; Varga Z.V.; Ferdinandy P.; Csont T. Low-dose endotoxin induces late preconditioning, increases peroxynitrite formation, and activates STAT3 in the rat heart. *Molecules* 2017, 22. [IF: 2,861]
- II. **Pipicz M.**; Varga Z.V.; Kupai K.; Gaspar R.; Kocsis G.F.; Csonka C.; Csont T. Rapid ventricular pacing-induced postconditioning attenuates reperfusion injury: Effects on peroxynitrite, RISK and SAFE pathways. *British Journal of Pharmacology* 2015, 172, 3472-3483. [IF: 5,259]

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 8,120

2. Az értekezéshez közvetlenül nem tartozó közlemények listája

- I. Kocsis G.F.; Sarkozy M.; Bencsik P.; **Pipicz M.**; Varga Z.V.; Paloczi J.; Csonka C.; Ferdinandy P.; Csont T. Preconditioning protects the heart in a prolonged uremic condition. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2012, 303, H1229-1236. [IF: 3,708]
- II. Varga Z.V.; Zvara A.; Farago N.; Kocsis G.F.; **Pipicz M.**; Gaspar R.; Bencsik P.; Gorbe A.; Csonka C.; Puskas L.G.; Thum T.; Csont T.; Ferdinandy P. MicroRNAs associated with ischemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischemic pre- and postconditioning: ProtectomiRs. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2014, 307, H216-227. [IF: 3,838]
- III. Csont T.; Murlasits Z.; Menesi D.; Kelemen J.Z.; Bencsik P.; **Pipicz M.**; Fekete V.; Zvara A.; Puskas L.G.; Ferdinandy P. Tissue-specific gene expression in rat hearts and aortas in a model of vascular nitrate tolerance. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2015, 65, 485-493. [IF: 2,462]
- IV. Sarkozy M.; Szucs G.; **Pipicz M.**; Zvara A.; Eder K.; Fekete V.; Szucs C.; Barkanyi J.; Csonka C.; Puskas L.G.; Konya C.; Ferdinandy P.; Csont T. The effect of a preparation of minerals, vitamins and trace elements on the cardiac gene expression pattern in male diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology* 2015, 14, 85. [IF: 4,534]

- V. Schreckenbergr R.; Rebelo M.; Deten A.; Weber M.; Rohrbach S.; **Pipicz M.**; Csonka C.; Ferdinandy P.; Schulz R.; Schluter K.D. Specific mechanisms underlying right heart failure: The missing upregulation of superoxide dismutase-2 and its decisive role in antioxidative defense. *Antioxidants & Redox Signaling* 2015, 23, 1220-1232. [IF: 7,093]
- VI. Csonka C.; Sarkozy M.; **Pipicz M.**; Dux L.; Csont T. Modulation of hypercholesterolemia-induced oxidative/nitrative stress in the heart. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, 2016, 3863726. [IF: 4,593]
- VII. Gaspar R.; **Pipicz M.**; Hawchar F.; Kovacs D.; Djirackor L.; Gorbe A.; Varga Z.V.; Kiricsi M.; Petrovski G.; Gacser A.; Csonka C.; Csont T. The cytoprotective effect of biglycan core protein involves Toll-like receptor 4 signaling in cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2016, 99, 138-150. [IF: 5,680]
- VIII. Sarkozy M.; Szucs G.; Fekete V.; **Pipicz M.**; Eder K.; Gaspar R.; Soja A.; Pipis J.; Ferdinandy P.; Csonka C.; Csont T. Transcriptomic alterations in the heart of non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Cardiovascular Diabetology* 2016, 15, 110. [IF: 4,752]

Az értekezéshez közvetlenül nem tartozó közlemények összesített impakt faktora: 36,660

A közlemények összesített impakt faktora: 44,780

1. Bevezetés

1.1. Az iszkémiás szívbetegségek jelentősége

Világszerte az iszkémiás szívbetegségek a vezető halálokok, melyeket a szívizom korlátozott vérellátása jellemez. A betegség-specifikus mortalitási adatokat tekintve a betegségcsoporton belül az akut miokardiális infarktusnak nagy jelentősége van, mely rendszerint egy hirtelen fellépő koszorúsér elzáródás következményeként kialakuló csökkent vérellátás során jön létre.

1.2. Az iszkémia/reperfúziós károsodás

Az oxigén- és tápanyaghiány miatt az iszkémia az idő előrehaladtával progresszív sejtelhalást hoz létre (iszkémiás károsodás). A reperfúziós terápia, azaz a szívizom vérellátásának helyreállítása csökkenti az infarktusméretet és a mortalitást. Azonban az iszkémiás károsodáson felül a reperfúzió további funkcionális romlást, infarktusméret növekedést, valamint az életet potenciálisan veszélyeztető aritmiákat eredményez, amiket összefoglalóan reperfúziós károsodásnak nevezünk.

1.3. Klasszikus iszkémiás kondicionálási eljárások

Az iszkémiás pre- és posztkondicionálás olyan eljárások, melyek a szív endogén protektív mechanizmusait aktiválva mérséklék a szív iszkémia/reperfúziós károsodását, egy hosszú letális iszkémiát megelőző vagy azt követő rövid iszkémia/reperfúziós ciklusok alkalmazásával. A prekondicionálás kedvező hatása kétfázisú: az eljárás alkalmazása után közvetlenül kialakuló korai védelem órákig tart, míg a késői fázis 12 órával később kezdődik és ~72 óráig tart.

1.4. Az iszkémiás kondicionálások mechanizmusa

Mindkét iszkémiás kondicionálási módszer molekuláris mechanizmusa részben hasonló: különböző trigger molekulák képződését serkentik, melyek receptor-függő vagy -független úton másodlagos jelátvivő molekulákon keresztül konvergálnak egy végső effektor, a mitokondrium felé, amelyen hatva kardioprotekciót váltanak ki.

Az utóbbi időben felmerült a peroxinitrit lehetséges trigger szerepe az iszkémiás kondicionálások hatásmechanizmusában. A peroxinitrit a szuperoxid anion ($O_2^{\cdot-}$) és a nitrogén-monoxid (NO^{\cdot}) nem enzimatis reakciójában keletkezik. A xantin oxidoreduktáz (XOR), valamint a NO^{\cdot} szintázok (NOS) felelősek elsősorban a prekursorok termelődésért. A peroxinitrit valószínűleg sejttúlélésért felelős jelátviteli utakat aktivál.

Az úgynevezett „reperfusion injury salvage kinase” (RISK) és „survivor activating factor enhancement” (SAFE) útvonalak a reperfüzió során aktiválódnak az iszkémiás kondicionálási eljárások hatására, hogy elősegítsék a sejt túlélését. Az extracelluláris szignál regulált-kináz 1/2 (ERK1/2) és protein kináz B (Akt) a RISK, a „signal transducer and activator of transcription 3” (STAT3) pedig a SAFE meghatározó kulcsfehérjéje. Mindkét jelátviteli út olyan sejtszintű folyamatokat mozdít elő, melyek a túlélés irányába mutatnak.

1.5. Alternatív kardioprotektív eljárások

Annak ellenére, hogy az iszkémiás pre- és poszt-kondicionálás hatékony kardioprotektív eljárás, számos limitáló és az eljárások kimenetével interferáló körülményt figyelembe kell venni (pl. a teljes reperfüzió sikertelensége a rövid iszkémia/reperfüziós ciklusok alkalmazásakor, kondicionáló algoritmusok vagy társbetegségek fennállása), melyek új alternatív kondicionálási módszerek kifejlesztésének szükségességét vetik fel. Számos farmakológiai (pl. endotoxin, antioxidánsok, ciklosporin) és nem farmakológiai (pl. gyors kamrai ingerlés, hő stressz, munka) stimulussal kiváltható kondicionálás.

A Gram-negatív bakteriális lipopoliszacharid (LPS) egy jól ismert kardioprotektív molekula. Egyszeri kis dózisu LPS kezelés 24 óra elteltével javítja a posztiszkémiás szívfunkciót azaz LPS-sel késői farmakológiai prekondicionálás váltható ki, melynek pontos molekuláris mechanizmusa nem tisztázott. Egyre több kísérletes eredmény jelzi, hogy a fokozott kardiális peroxinitrit szint szerepet játszhat a késői iszkémiás prekondicionálásban. Mindazonáltal a kis dózisu LPS késői hatása nem ismert a kardiális peroxinitrit képződésre. A jelátviteli utakat eddig nem teljes körűen tanulmányozták az LPS indukálta prekondicionálásban. Az Akt aktiváció szerepet játszhat a mechanizmusban, azonban az ERK1/2 és STAT3 lehetséges szerepét még nem tesztelték.

A farmakológiai megközelítések mellett számos egyéb eljárás létezik az endogén adaptációs mechanizmusok toborzására. Az irodalomban jól ismert, hogy a szívfrekvencia befolyásolja az iszkémia/reperfüziós károsodást, valamint egy hosszú káros iszkémia előtt alkalmazott periodikus gyors kamrai ingerlésnek anti-iszkémiás hatása van, amit gyors kamrai ingerléssel kiváltott prekondicionálásnak neveznek. Azonban nem ismert, hogy vajon a reperfüzió során spontán kialakult kamrai tachiaritmiák (ventrikuláris tachikardia (VT) és fibrilláció (VF)) befolyásolja-e az infarktusméretet, és vajon az iszkémiát követően alkalmazott gyors kamrai ingerléssel, mint új alternatív poszt-kondicionálási eljárással, csökkenthető-e a reperfüziós károsodás. Továbbá a gyors kamrai ingerlés hatása sem ismert a miokardiális peroxinitrit, RISK és SAFE jelátviteli utak vonatkozásában.

2. Célkitűzések

Alternatív kondicionálási eljárások fejlesztése és tesztelése nélkülözhetetlen a kardioprotektív mechanizmusok részletesebb megértéséhez. Ezért jelen munkánkban az iszkémiás pre- és poszt kondicionálás egy-egy alternatív módszerét vizsgáltuk: az LPS indukálta késői prekondicionálást és a gyors kamrai ingerléssel kiváltott poszt kondicionálást. Annak érdekében, hogy az előző fejezetben leírt, alternatív módszerekkel kapcsolatos tudományos ismerethiányt részben tisztázhassuk, a két alternatív eljárás vizsgálata során a következő specifikus kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. A kis dózisú kardioprotektív LPS-nek van-e késleltetett hatása a miokardiális peroxinitrit képződésre az endotoxin kiváltotta késői prekondicionálásban?
2. Hogyan befolyásolja a kis dózisú LPS kezelés a kardiális RISK és SAFE jelátviteli utakat az endotoxin indukálta prekondicionálás késői fázisában?
3. Van-e összefüggés a reperfúzió során fellépő spontán kamrai tachiaritmiák (VT, VF vagy VT+VF) időtartama és az infarktusméret között?
4. A reperfúzió kezdetén létrehozott rövid idejű gyors kamrai ingerlés csökkenti-e a reperfúziós károsodást, alkalmazásával kiváltható-e poszt kondicionálás?
5. A peroxinitrit potenciálisan szerepet játszhat-e a gyors kamrai ingerléssel kiváltott poszt kondicionálásban?
6. Milyen hatása van a gyors kamrai ingerlésnek a kardiális RISK és SAFE jelátviteli utakra, mint lehetséges downstream célpontokra?

3. Anyagok és módszerek

Az alternatív kondicionálási módszereket izolált szívperfúziós rendszereken teszteltük több kísérleti elrendezést alkalmazva.

3.1. Kísérleti elrendezések

3.1.1. LPS indukálta késői prekondicionálás

Hím Wistar patkányokat *in vivo* intraperitoneálisan 0,5 mg/ttkg LPS-sel (*Salmonella enterica* Typhimurium szerotípus) vagy annak oldószerével, fiziológias sóoldattal oltottuk ($n = 6-7$ mindkét csoportban). 24 óra elteltével a szíveket izoláltuk és Langendorff szerint 5 percig perfundáltuk. Ezt követően dolgozó módra váltottunk Neely szerint recirkuláló oldattal. A szíveket 15 perc ekvilibrációnak, 30 perc normoterm globális iszkémiának és 20 perc reperfúziónak tettük ki. Az iszkémia előtt és után szívfunkciós paramétereket és koronária perfuzátumokban laktát dehidrogenáz (LDH) aktivitást mértünk. Független kísérletben 5 perces átmosást követően a szíveket biokémiai vizsgálatokra használtuk fel ($n = 5-12$ mindkét csoportban). A pitvarok eltávolítását követően a kamrákat gyorsan folyékony nitrogénben fagyasztottuk, mozsárban pisztilussal porítottuk és $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztó csövekben tároltuk a miokardiális peroxinitrit, RISK és SAFE jelátviteli utak vizsgálatáig.

3.1.2. Gyors kamrai ingerléssel kiváltott posztkondicionálás

Meta-analízist végeztünk annak érdekében, hogy megválaszoljuk a kérdést: van-e összefüggés a reperfúzió során fellépő spontán kamrai tachiaritmiák időtartama és az infarktusméret között. 30 perc regionális iszkémiát és 120 perc reperfúziót alkalmazó korábbi hat tanulmányunk során rögzített elektrokardiogramokat és infarktusméreteket elemeztünk. A reperfúzió első 10 percében fellépő, reperfúzió indukálta aritmiákat analizáltuk és értékeltük a teljes aritmia időtartam alapján, külön VT, VF és VT+VF lebontásban.

A reperfúzió kezdetén alkalmazott rövid idejű gyors kamrai ingerlés potenciális kardioprotektív hatásának vizsgálatához, a következő perfúziós protokollt használtuk. Az iszkémia/reperfúziós kontroll szíveket 15 perc ekvilibrációnak, 30 perc regionális iszkémiának, majd 120 perc reperfúziónak tettük ki. Az iszkémiás posztkondicionálást a reperfúzió első két percében, 6 egymást követő 10 s reperfúzió – 10 s globális iszkémia ciklusok alkalmazásával váltottuk ki. A gyors kamrai ingerléssel kiváltott posztkondicionálás során a reperfúzió első két percében, azonos időközönként, 6 alkalommal a szív saját ritmusát 10 s 600 ütés/perces gyors kamrai ingerléssel váltottuk fel. Posztiszkémiás LDH kibocsátást ($n = 5$ csoportonként), infarktusméretet ($n = 12$ csoportonként) és reperfúzió indukálta

tachiaritmiákat ($n = 11-14$ csoportonként) vizsgáltunk. Külön kísérletben hasonló perfúziós protokollt alkalmazva, a reperfúzió 7. percében az iszkémiának kitett kamrai területből vizsgáltuk a miokardiális peroxinitrit szintet, a RISK és SAFE jelátviteli utakat ($n = 5$ csoportonként).

3.2. Izolált szívperfúzió

Kísérleteinkhez hím Wistar patkányokat (250 – 400 g) használtunk. Az állatokat általános inhalációs anesztézia indukciója céljából dietil-éterrel, a kardioprotekcióval nem interferáló anesztetikummal átítatott törlőpapírt tartalmazó üvegekamrába helyeztük. A szívizoláció során az állatok orrához tartott főzőpohárból folyamatosan párolgó éter biztosította az anesztézia fenntartását. A szíveket 500 U/ttkg dózisú intravénás heparinizálást követően izoláltuk, majd 37 °C-on Langendorff szerint 95% O₂ és 5% CO₂ gázkeverékkel átáramoltatott Krebs-Henseleit oldattal (NaCl 118 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 4,3 mM, CaCl₂ 2,4 mM vagy 1,4 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, glükóz 11 mM) perfundáltuk konstans 100 vízcentiméteres (9,8 kPa) nyomáson. Neely szerinti recirkuláló dolgozó módban az előterhelés 1,7 kPa, az utóterhelés pedig 9,8 kPa volt. A koronária áramlást a koronáriakon egységnyi idő alatt keresztülfolyó perfuzátum mennyiségének mérésével határoztuk meg és ml/perc formában fejeztük ki.

A globális iszkémiát az aorta kanül elzárásával hoztuk létre. A regionális iszkémia kivitelezésére az elülső leszálló koronária eredéshez közeli aláöltésével (3-0-as fonal) és leszorításával (100 grammos mérő súly) került sor. Az iszkémia megfelelő kivitelezését a koronária áramlás monitorizálásával ellenőriztük.

A gyors kamrai ingerlést a jobb kamra csúcshoz közeli felszínére helyezett stimuláló elektródán keresztül 600 ütés/perces frekvenciájú, 1V és 1mA kimeneti értékeken 5 ms négyszögimpulzusok alkalmazásával váltottuk ki (Elektromos stimulátor, Experimetria Kft., Budapest), a földelő elektródát az aorta kanülre helyeztük.

3.3. Laktát dehidrogenáz kibocsátás meghatározása

A szívizomkárosodás mértékének megállapítására megmértük az LDH aktivitást az 5 percen keresztül gyűjtött koronária perfuzátumokban. Az enzimaktivitást (U/ml) a megfelelő koronária áramlással (ml/perc) megszorozva az LDH kibocsátást U/percben fejeztük ki.

3.4. Infarktusméret meghatározása

A perfúziós protokoll végén az elülső leszálló koronária újbóli leszorításával és Evans kék perfundálásával meghatároztuk a rizikózónát. Ezután a szívseleteket 2,3,4-trifenil-tetrazólium-klorid oldatban inkubáltuk, hogy vizualizáljuk a még élő szöveteket. Végezetül a rizikózónára vonatkoztatott infarktusméretet planimetriás módszerrel határoztuk meg.

3.5. Aritmia elemzés

A reperfúzió indukálta aritmiák értékeléséhez epikardiális EKG regisztrátumokat analizáltunk az eredeti Lambeth konvenciók alapján.

3.6. Biokémiai vizsgálatok

A kardioprotektív kis dózisú LPS és gyors kamrai ingerlés miokardiális peroxinitrit képződésre, RISK és SAFE aktivációra gyakorolt hatásának vizsgálatához a következő biokémiai méréseket végeztük.

A kardiális peroxinitrit szintet indirekt módon, a peroxinitrit marker 3-nitrotirozin enzimkapcsolt immunoszorbens vizsgálat segítségével határoztuk meg. A peroxinitrit prekursor, $O_2^{\cdot-}$ és NO^{\cdot} szintjét is értékeltük. A $O_2^{\cdot-}$ lucigenin kemilumineszcencia méréssel vagy dihidroetidium festéssel került meghatározásra. A NO^{\cdot} -ot pedig gyökfogást követően elektron paramágneses rezonancia elvén mértük meg. A kis dózisú LPS indukálta $O_2^{\cdot-}$ és NO^{\cdot} lehetséges forrásainak feltárásához XOR, valamint Ca^{2+} -függő és Ca^{2+} -független NOS enzimaktivitásokat mértünk.

Az ERK1/2, Akt és STAT3 aktiválódását a fehérjék foszforilált arányának standard Western blot alapú vizsgálatával határoztuk meg, hogy feltárjuk a RISK és SAFE jelátviteli utak lehetséges szerepét az alternatív kondicionálási eljárások molekuláris mechanizmusában.

3.7. Statisztikai analízis

Adatainkat a kísérleti elrendezéstől függően kétmintás *t*-próbával, egyutas vagy kétutas variancia-analízissel (ANOVA), vagy Fisher-féle egzakt teszt segítségével elemeztük $p < 0,05$ szignifikancia szint mellett.

4. Eredmények

4.1. A kis dózisú endotoxin előkezelés javítja a posztisztkémiás szívfunkciót és csökkenti az LDH kibocsátást

A kis dózisú endotoxin késői kardioprotektív hatásának igazolása érdekében meghatároztuk a kardiális teljesítményt 24 óra globális iszkémiának kitett izolált szívekben, *in vivo* LPS (*S. typhimurium*; 0,5 mg/ttkg ip.) vagy fiziológiás sóoldat alkalmazását követően. Az állatok testtömegében és a szívek nedves tömegében nem volt különbség a kontroll csoport és az LPS-sel előkezelt csoport között. A globális iszkémiát követő reperfúzió során mindkét kísérleti csoportban romlott a szívfunkció.

Az iszkémiát megelőző értékekhez viszonyítva az iszkémiát követően az aortaáramlás, koronária áramlás, szívperctérfogat, szívfrekvencia, bal kamrában kifejlődött nyomás és ennek első deriváltjának maximuma és minimuma ($\pm dp/dt_{max}$) csökkent, míg a bal kamrai végdiasztolés nyomás emelkedett. Az LPS előkezelés szignifikánsan javította az aortaáramlás, szívperctérfogat, bal kamrában kifejlődött nyomás és $+dp/dt_{max}$ értékeinek posztisztkémiás csökkenését. A koronária áramlás, $-dp/dt_{max}$, bal kamrai végdiasztolés nyomás és szívfrekvencia iszkémia utáni értékeit nem befolyásolta szignifikánsan a kis dózisú LPS előkezelés.

A globális iszkémiát követően, a reperfúzió elején az LDH kibocsátás jelentősen fokozódott a kontroll csoportban. Ezzel ellentétben, a kis dózisú LPS előkezelés megakadályozta a posztisztkémiás LDH kibocsátást.

4.2. Az LPS előkezelés fokozza a miokardiális 3-nitrotirozin képződést, $O_2^{\cdot-}$ és NO^{\cdot} termelődést, XOR és NOS aktivitást

A kardioprotektív LPS miokardiális peroxinitrit szintre vonatkozó késleltetett hatásának vizsgálata céljából megmértük a kardiális szabad 3-nitrotirozin szintet. A kis dózisú LPS szignifikánsan növelte a miokardiális 3-nitrotirozin képződést 24 órával az *in vivo* kezelést követően.

A kis dózisú LPS indukálta fokozott peroxinitrit képződés háttérének vizsgálata érdekében meghatároztuk a peroxinitrit prekursor $O_2^{\cdot-}$ és NO^{\cdot} szintjeit. Az LPS-sel előkezelt szívekben mind a $O_2^{\cdot-}$, mind a NO^{\cdot} szintje szignifikánsan megemelkedett.

A kis dózisú LPS által kiváltott fokozott $O_2^{\cdot-}$ és NO^{\cdot} szintek lehetséges forrásának feltárása érdekében meghatároztuk a XOR és NOS enzimek aktivitását. A XOR és a Ca^{2+} -független NOS enzimek aktivitása szignifikánsan megemelkedett az LPS-sel előkezelt szívekben, anélkül, hogy a kezelés hatással lett volna a Ca^{2+} -függő NOS aktivitására.

4.3. Az LPS előkezelés fokozott STAT3 foszforilációt eredményez, ezáltal jelezve a SAFE útvonal aktivációját

A kis dóziszú LPS lehetséges downstream molekuláinak meghatározása céljából megvizsgáltuk az ERK1/2, Akt és STAT3 foszforilációs szintjeit 24 órával az LPS előkezelést követően. A kis dóziszú LPS szignifikánsan fokozta a kardiális STAT3 foszforilációját és nem-szignifikánsan emelte az Akt foszforilációt, anélkül, hogy hatással lett volna az ERK1/2-re.

4.4. A reperfüzió indukálta kamrai tachikardia és/vagy fibrilláció időtartama csökkent infarktusmérettel áll összefüggésben

Meta-analízist végeztünk annak érdekében, hogy megválaszoljuk a kérdést: van-e összefüggés a reperfüzió során fellépő spontán kamrai tachiaritmiák és az infarktusméret között. Kutatócsoportunk által korábban végzett, ugyanolyan kísérleti elrendezést alkalmazó hat tanulmányunk (iszkémia/reperfüzióknak kitett izolált patkány szívek) meta-analízise kimutatta, hogy a VT, VF vagy VT+VF jelenléte – melyek időtartama 60 s-nál hosszabb a reperfüzió első 10 percében – jelentősen csökkent infarktusmérethez társul.

4.5. A gyors kamrai ingerlés kardioprotektív hatást fejt ki: mérsékli az infarktust és a reperfüzió kiváltotta aritmiákat

A gyors kamrai ingerlés lehetséges kardioprotektív hatásának tanulmányozása céljából meghatároztuk a miokardiális infarktusméretet, az LDH kibocsátást és elemeztük a reperfüzió által kiváltott aritmiákat.

A rövid idejű periodikus gyors kamrai ingerlés szignifikánsan csökkentette a rizikózónára vonatkoztatott infarktusméretet, az iszkémiás poszt kondicionáláshoz hasonlóan. Az iszkémiát követő LDH kibocsátás szignifikánsan mérséklődött a gyors kamrai ingerlés hatására. Az iszkémiás poszt kondicionálás szintén csökkentette az LDH kibocsátást, bár a különbség nem érte el a statisztikai szignifikancia szintet.

A rövid idejű periodikus gyors kamrai ingerlés csökkentette a reperfüzió indukálta VT előfordulását, anélkül, hogy szignifikáns mértékben befolyásolta volna VF-et. Ezzel ellentétben, az iszkémiás poszt kondicionálás nem volt szignifikáns hatással a VT és VF előfordulására jelen tanulmányunkban.

Az állatok testtömegében, a szívek nedves tömegében, a szívfrekvencia kiindulási értékében és a koronária áramlás értékeiben (kiindulási, iszkémia kezdeti és reperfüzió végi értékek) nem volt különbség a kísérleti csoportok között. Az iszkémiás poszt kondicionálással ellentétben, a rövid idejű periodikus gyors kamrai ingerlés nem befolyásolta a reperfüzió kezdetén a koronária áramlást, az iszkémia/reperfüziós kontrollhoz viszonyítva.

4.6. A peroxinitrit feltételezhetően szerepet játszik a gyors kamrai ingerlés által kiváltott poszt kondicionálásban

Hogy betekintést nyerhessünk a gyors kamrai ingerlés kedvező hatásának mechanizmusába, meghatároztuk a kardiális 3-nitrotirozin és $O_2^{\cdot-}$ szinteket a reperfúzió 7. percében 30 perces iszkémiát követően. A gyors kamrai ingerlés indukálta poszt kondicionálás szignifikánsan fokozta a kardiális peroxinitrit marker 3-nitrotirozin szintet az iszkémiás poszt kondicionáláshoz hasonlóan. Emellett a peroxinitrit prekursor $O_2^{\cdot-}$ enyhén, de szignifikáns mértékben megemelkedett mindkét poszt kondicionálási csoportban.

Annak további bizonyítására, hogy a poszt kondicionálási manőverek nitratív stresszt váltanak ki, meghatároztuk a kardiális 3-nitrotirozin szintet egy olyan esetben is, amikor iszkémia nem előzte meg a poszt kondicionáló stimulusokat. A rövid iszkémia/reperfúziós ciklusok vagy periodikus gyors kamrai ingerlés alkalmazása fokozta a kardiális 3-nitrotirozin képződését megelőző iszkémia hiányában is.

4.7. Az ERK1/2, Akt és STAT3 fehérjék foszforilációs aránya nem változott a gyors kamrai ingerlés kiváltotta kardioprotekció során

A gyors kamrai ingerlés által indukált poszt kondicionálás lehetséges downstream célpontjainak meghatározása céljából megvizsgáltuk a RISK és SAFE útvonalakat.

A gyors kamrai ingerlés az iszkémiás poszt kondicionáláshoz hasonlóan nem-szignifikáns mértékben fokozta az Akt foszforilációját iszkémiát követően, anélkül, hogy befolyásolta volna az ERK1/2 és a STAT3 foszforilációt.

4.8. A rövid idejű periodikus gyors kamrai ingerlés fokozta a STAT3 foszforilációt megelőző iszkémia hiányában

Megvizsgáltuk az iszkémiás poszt kondicionálás és a gyors kamrai ingerlési manőverek lehetséges hatásait a miokardiális RISK és SAFE útvonalakra megelőző iszkémia hiányában is. A rövid idejű periodikus gyors kamrai ingerlés fokozta a STAT3 foszforilációt ellentétben a rövid iszkémia/reperfúziós ciklusok alkalmazásával. Megelőző iszkémia nélkül egyik protokoll sem befolyásolta szignifikáns mértékben az Akt és az ERK1/2 foszforilációját.

5. Megbeszélés és következtetések

Jelen munkánkban az iszkémiás pre- és poszt kondicionálás egy-egy alternatív módszerét vizsgáltuk: az LPS indukálta késői pre kondicionálást és a gyors kamrai ingerléssel kiváltott poszt kondicionálást, fókuszálva ezen módszerek miokardiális peroxinitritre, RISK és SAFE jelátviteli utakra gyakorolt hatására.

Új eredmények

- a kis dózisú LPS előkezelés fokozza a miokardiális peroxinitrit marker, 3-nitrotirozin képződését
- a kis dózisú LPS előkezelés fokozza a STAT3 foszforilációt, jelezve ezzel a SAFE útvonal aktiválódását
- a reperfúzió elején kialakuló endogén gyors kamrai aritmiákhoz kisebb infarktusméret társul
- a reperfúzió kezdetén alkalmazott rövid idejű periodikus gyors kamrai ingerlés csökkenti a reperfúziós károsodást, poszt kondicionálást vált ki
- a peroxinitrit valószínűleg szerepet játszik a gyors kamrai ingerléssel kiváltott poszt kondicionálásban
- a RISK és SAFE jelátviteli utak nem aktiválódnak a gyors kamrai ingerlés által kiváltott kardioprotekcióban

Az iszkémiás pre kondicionálás széleskörűen alkalmazott módszer a szív iszkémia/reperfúziós károsodás elleni védelmében. Azonban invazív módszer, így megelőző eljárásnak való alkalmazása a mindennapi életben korlátozott. Ehelyett, a farmakológiai pre kondicionálás egy non-invazív módja a védelem kifejtésének, ezáltal kiváló megelőző és terápiás értéke lehet a kardiovaszkuláris betegségek területén. A kis dózisú LPS előkezelés késői farmakológiai pre kondicionálást vált ki és fokozza a kardialis peroxinitrit képződést 24 órával a kezelést követően, azáltal, hogy a XOR és a Ca^{2+} -független NOS enzimeken keresztül emeli a $\text{O}_2^{\cdot-}$ és NO^{\cdot} termelődést a szívben. A potenciálisan letális iszkémia előtti STAT3 aktiváció valószínűleg szerepet játszik az endotoxin indukálta késői pre kondicionálás protektív hatásában.

A meta-analízisünk kimutatta, hogy a 60 s-nál hosszabb ideig tartó, reperfúzió kiváltotta VT/VF-hez csökkent infarktusméret társul. Ezen eredmények interpretálása bonyolult, mivel ok-okozati viszonyokat nem vizsgáltunk jelen tanulmányunkban. Eredményeinek lehetséges magyarázata, hogy az infarktusméret befolyásolja a hosszantartó VT és/vagy VF

előfordulását, míg egy másik lehetőség, hogy a reperfúzió elején fellépő hosszabb tachiaritmiák valamely módon csökkentik az infarktus kialakulását. Legjobb tudomásunk szerint az utóbbi megközelítést még nem vizsgálták az irodalomban, ezért megvizsgáltuk, hogy vajon az exogén kontrollált tachikardia képes-e kardioprotekciót kiváltani.

A reperfúzió kezdetén alkalmazott rövid idejű periodikus gyors kamrai ingerlés kedvezően befolyásolja a reperfúziós károsodás két lényeges komponensét: csökkenti az infarktusméretet és a reperfúzió indukálta tachikardia előfordulását. Eredményeink alapján a gyors kamrai ingerlés fokozza a peroxinitrit szintet, ami nagy valószínűséggel trigger szerepet tölthet be a kardioprotektív mechanizmusban, hasonlóan az iszkémiás poszt kondicionáláshoz. Mindazonáltal a gyors kamrai ingerlés feltételezhetően RISK és SAFE független jelátviteli utakon keresztül fejti ki kedvező hatását, ezért további kísérletek szükségesek a lehetséges downstream molekulák azonosítására. Mivel a gyors kamrai ingerlés az iszkémiás poszt kondicionáláshoz hasonló kardioprotektív hatással rendelkezik, úgy véljük, hogy hatékony alternatívája lehet a klasszikus módszernek. Ezen felül a gyors kamrai ingerlés kivitelezése kontrolláltabb módon tud megvalósulni, mint a rövid idejű iszkémia/reperfúziós ciklusok alkalmazása, ezáltal jelentős technikai előnnyel rendelkezhet a klasszikus iszkémiás módszerhez viszonyítva.

Végezetül megállapíthatjuk, hogy a peroxinitrit valamilyen módon szerepet játszhat mindkét alternatív kardioprotektív eljárás hatásmechanizmusában, ugyanakkor a RISK és SAFE útvonalak szerepe pontosan nem világos és részben különbözőnek tűnik az egyes alternatív eljárások tekintetében.

6. Köszönetnyilvánítás

Kísérleteink az Országos Tudományos Kutatási Alapprogram (OTKA K79167 és F046810), valamint a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKTH MED_FOOD, TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0005, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035) támogatásával valósultak meg. Az értekezés a GINOP-2.3.2-15-2016-00040 (MYOTeam) projekt keretében készült.

Őszinte köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dux Lászlónak, hogy lehetővé tette munkámat a Biokémiai Intézetben és Prof. Ferdinandy Péternek, a Kardiovaszkuláris Kutatócsoport vezetőjének.

Szívből jövő hálával tartozom témavezetőimnek, Csont Tamásnak és Csonka Csabának. Az ő éveken át tartó támogatásuk, irányításuk, bátorításuk és barátságuk nélkül ez az értekezés nem jöhetett volna létre.

Külön köszönöm Varga V. Zoltánnak a tanítást, a jelentős tudományos hozzájárulást, a baráti támogatást és a találó javaslatokat.

Különösen hálás vagyok Gáspár Renátának a sokévi közös munkáért, a konstruktív észrevételeiért és kitartó bátorításáért.

Szeretnék köszönetet mondani a kutatócsoport tagjainak: Kocsis F. Gabriellának, Fekete Veronikának, Sárközy Mártának, Szücs Gergőnek, Pálóczi Jánosnak, Kupai Krisztinának, Bencsik Péternek, Görbe Anikónak, Kiss Krisztinának, Sárváry-Arantes Lászlónak és a Biokémiai Intézet minden munkatársának. Kiemelkedő technikai és adminisztratív segítséget kaptam Török Szilviától, Balázsházy Erzsébettől, Hawchar Fatimétől, Makráné Felhő Zitától, Kovács Judittól, Bagi Nórától, Lajtós Zsuzsannától, Szunyi Klárától, Makra Évától, Bodnár Tündétől, Engi Ildikótól és Ocsovszki Imrétől.

Mindezen túl, nagyon hálás vagyok a családom támogatásáért. Az ő segítségük nélkül ez az értekezés nem valósulhatott volna meg. Emellett a végső szakaszban Demján Virág nyújtott biztos háttérrel, átsegítve ezzel a felmerülő nehézségeken. Ezt a munkát szeretném neki és a családomnak ajánlani.